

平成 30 年 4 月 13 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26450194

研究課題名(和文) 微弱発光計測技術を応用した遅延蛍光のオンサイト計測による樹木の活力診断手法の開発

研究課題名(英文) Development of on-site tree vigor diagnosis method based on delayed fluorescence by applying very-weak light measurement technology

研究代表者

今西 純一 (IMANISHI, Junichi)

京都大学・地球環境学堂・助教

研究者番号：80378851

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：樹木の活力診断は、樹木の健全な育成や安全管理に欠かせない。遅延蛍光は、光合成の逆反応によって微弱な発光が生じる現象であり、遅延蛍光の計測によって植物のストレスを高感度に評価することができると言われている。そこで、本研究は、微弱発光計測技術を応用し、遅延蛍光に基づいて樹木の活力度を現場で評価するための手法を開発することを目的とした。オンサイト型微弱発光計測装置を試作して、野外植栽のサクラ類を対象に遅延蛍光の計測を行い、活力度評価の可能性を検討した。その結果、サクラ類の生育状態(良好・不良の傾向)を8割程度の正答率で予測可能であるとの示唆が得られた。

研究成果の概要(英文)：Tree vigor diagnosis is essential for growing healthy trees and safety management. Delayed fluorescence is a phenomenon of light emission caused by backward reaction in photosynthesis. It is said that stress condition in plants can be assessed with high sensitivity by measuring delayed fluorescence. Therefore, this study aimed to develop an on-site assessment method of tree vigor based on delayed fluorescence. An on-site system for measuring very-weak light was built as a trial manufacture. Then, by measuring delayed fluorescence of flowering cherry trees planted in field, possibility of tree vigor assessment was studied. Consequently, it was indicated that growth condition (trend of good or bad growth) of the cherry trees is likely to be predicted with ca. 80 % correct answer rate.

研究分野：造園学

キーワード：遅延蛍光 光合成 樹木 活力度評価 造園 緑化

1. 研究開始当初の背景

街路樹や公園樹、庭園樹の管理において、樹木の活力を診断することは、樹木を健全に育成してその価値を高めたり、倒木を未然に防ぐ安全管理において欠かせない。しかし、現在、植栽現場において、活力度は樹木の外観等により経験的に判定されることが多い。また、調査研究においても科学技術庁資源調査会の「4ランク評価法」やその変法を用いることが多い。いずれも樹勢や樹形を基準とするため、調査者の主観が入りやすく個人差が生じやすいという問題がある。

遅延蛍光(遅延発光とも呼ばれる)は、緑色植物や藻類、光合成細菌に光を照射した後、数十ナノ秒~分、あるいはそれ以上遅れて発せられる赤~近赤外域の光である。光照射後、5ナノ秒よりも短い時間に発せられる光は、クロロフィル蛍光として区別され、発光の機構が異なる。遅延蛍光は、光合成の異なるプロセスからの逆反応の結果、微弱な発光が生じる現象であり、励起光下で観察されるクロロフィル蛍光よりも、光合成の様々なプロセスの情報を直接的に反映しているという利点をもつ。また、遅延蛍光の減衰曲線は、光合成のプロセスを反映するいくつかの成分からなり、それら进行评估することにより光合成の変化を高感度に評価することができると言われている。しかし、遅延蛍光の強度は、クロロフィル蛍光よりも少なくとも2桁ほど低いため、高度な計測技術が必要であり、クロロフィル蛍光に比べて研究の蓄積が少ない。また、光合成の基礎研究での利用は比較的多いが、農林分野において植物の活力度評価に応用された例は少ない。

2. 研究の目的

本研究課題は、微弱発光計測技術を応用し、遅延蛍光に基づいて樹木の活力度を現場で客観的に評価するための手法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

オンサイト型微弱発光計測装置を試作して、暗処理の方法や励起光の強度、照射時間等を調整し、遅延蛍光データを安定して取得可能な条件を調べた。その後、本装置を用いて、実際に野外に植栽されている樹木を対象に遅延蛍光データを取得し、樹木の活力度評価への応用可能性について検討した。以下に、本研究課題の主要な成果である野外植栽木を対象とした試験の概要について記載する。

野外植栽木のデータ取得は2016年6月6日から7月27日に、京都市内の傾斜30~40°の西向き山地斜面のサクラ類植栽地にて実施した。当地には2000年にサクラ類約750本が植栽された。しかし、高密度な植栽によって、樹高に比較して樹冠サイズが相対的に小さくなったことが主な原因で、近年は個体が衰退傾向にあった。

計測対象木は、胸高直径や樹高の測定結果

や、目視による4ランク活力度評価の結果を参考に、様々な活力状態の個体を27本選定した。なお、4ランク活力度評価は、樹形、枝の伸長量、梢端の枯損、枝葉の密度、葉の形と大きさ、葉色、樹皮の7項目について2名で実施した。

次いで、対象木に梯子を使って上り、樹頂部において平均的な成長を示す枝を1つ選定して、2m以上の長さで枝を採取した。採取した枝は数分以内にコンクリート製の小屋に運搬した。小屋内は環境光3~5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、気温19~25℃、相対湿度76~89%を維持しており、屋外よりも安定した環境であった。運搬した枝は1.5mの長さに切りそろえた。また、暗処理中の蒸散による水ストレスを抑制するために、計測対象とした3枚と予備の2枚の葉は枝に付いた状態のまま保持したが、それ以外の不要な枝と葉はすべて切り落とした。

計測対象とする葉に暗処理を30分間実施することにより、暗処理前の照射光の影響を取り除いた。オンサイト型の微弱発光計測装置(浜松ホトニクス社製、微弱発光計測装置C12934、携帯型プロトタイプ)を用いて、赤色LED(ピーク波長687nm)により22 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の励起光を5秒間照射した後、120秒間、0.1秒刻みで遅延蛍光の強度(以降、DFと表記)を計測した。

その後、クロロフィル蛍光をFluorPen FP100 MAX(Photon Systems Instruments社製)を用い、LC3モードを使用して10、20、50、100、300、500、1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の7段階の定常励起光強度下で量子収率を計測した。なお、本計測の最初に光化学系IIの最大量子収率であるFv/Fmが計測される。

クロロフィル蛍光の計測後に、葉緑素計SPAD-502(コニカミノルタ社製)を使用して1枚の葉につき3点ずつ、葉緑素計値(SPAD値)を計測した。また、各葉の付いている枝の当年、前年および前々年の伸長量を、芽鱗痕を指標にすることによって計測した。

4ランク活力度評価の7変数について、R ver. 3.11のパッケージpsychを使用して、カテゴリー主成分分析(PCA with optimal scaling, オプティミム回転)を行った。カテゴリー主成分分析の第1因子(軸名MR2、寄与率54%)に着目し、MR2の値<0を生育良好、MR2 \geq 0を生育不良に区分した。この生育状態の良・不良を目的変数とし、遅延蛍光およびFv/Fmを説明変数とする分類木モデルを、R ver. 3.11のパッケージrpartを使用して構築した。なお、遅延蛍光のデータについては、0.1~1.0秒については瞬間値をそのまま利用したが、1.1秒以降は一定時間の積算値を計算し、ノイズの低減を図った。具体的には、1.1~10.0秒までは1秒間隔で1秒間の積算値を、10.1~120.0秒までは10秒間隔で10秒間の積算値を求めた。以降、例えば、1.1~2.0秒の積算値は2.0秒、10.1~20.0秒の積算値は20.0秒と表記する。ま

た、上記の瞬間値あるいは積算値を任意に 2 つ組み合わせ、2 時点の DF の比を計算し、分類木モデルの説明変数として投入した。

同じ個体であっても、葉ごとに異なる予測結果が生じた場合には、個体の予測結果は 3 枚の葉の予測結果の多数決により決定した。

予測モデルの性能は、IBM SPSS Statistics ver. 24 を使用して、受信者操作特性 (ROC) 曲線の曲線下面積 (AUC) と Kappa 係数により評価した。

分類木モデルの各末端グループについては、第 1 分岐で良好と予測されたグループを Good 1、第 3 分岐で良好と予測されたグループを Good 3、第 2 分岐で不良と予測されたグループを Bad 2、第 3 分岐で不良と予測されたグループを Bad 3 と名付けた。各グループの正しく予測されたサンプルについて、胸高直径や樹高、SPAD 値、当年、前年および前々年の枝の伸長量、量子収率にグループ間で差があるかを、Brunner-Munzel 検定に Bonferroni 補正を適用して検討した (有意水準 5%)。

4. 研究成果

カテゴリー主成分分析の第 1 因子 (MR2, 寄与率 54%) は、枝の伸長量、梢端の枯損、枝葉の密度、葉の形・大きさの因子負荷量がいずれも 0.83 以上と大きく、第 1 因子は樹木の活力度を表していると解釈された。第 1 因子によって区分された生育良好木と生育不良木はそれぞれ 14 本と 13 本であった。

サクラ類の生育状態 (良・不良の別) を予測する分類木モデルの分岐条件は、以下の通りであった。第 1 分岐: 10.0 秒の DF が 5.088×10^5 以上のケースは「良」と予測 (Good 1)。第 2 分岐: 第 1 分岐において 10.0 秒の DF が 5.088×10^5 未満のケースについて、9.0 秒の DF / 8.0 秒の DF (2 時点の DF の比) が 0.7954 未満であれば「不良」と予測 (Bad 2)。第 3 分岐: 第 1 分岐において 10.0 秒の DF が 5.088×10^5 未満であり、また第 2 分岐において 9.0 秒の DF / 8.0 秒の DF が 0.7954 以上のケースについて、3.0 秒の DF / 2.0 秒の DF が 0.5691 以上であれば「不良」と予測 (Bad 3)、それ以外は「良」と予測 (Good 3)。

葉レベルの正答率は 82.7% (67 枚/81 枚)、個体レベルの正答率は 85.1% (23 本/27 本) であった。ROC 曲線の AUC は、葉レベルで 0.853 であり中程度の正確さ、個体レベルで 0.932 であり高い正確さを有していると評価された。Kappa 係数は、葉レベルで 0.653、個体レベルで 0.702 であり、いずれも十分な (substantial) 正確さを有していると評価された。

分類木モデルの各末端グループに入ったサンプルのうち正しく予測されたものの特徴を統計解析した結果、Good 1 の特徴として以下の特徴が挙げられた。4 ランク評価 (CATPCA MR2 スコアや 4 ランク評価平均値) が Bad 2 や Bad 3 より良好で、SPAD 値が Bad

2 や Bad 3 より高く、当年枝成長量が Bad 2 や Bad 3 よりも多いことから、調査時点での生育状態は良好傾向であった。また、胸高直径が Bad 2 や Bad 3 より大きく、樹高が Bad 2 や Bad 3 より高く、前年枝および前々年枝成長量は Bad 3 より多いことから、長期的にも生育状態は良好傾向であった。光化学系 II の量子収率については、Good 1 は Fv/Fm が Bad 2 より大きく、定常励起光強度 100, 300, 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ のフェーズで量子収率が Bad 2 より高く、定常励起光強度 50, 100, 300, 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ のフェーズで量子収率が Good 3 より高いことから、Good 1 は Bad 2 や Bad 3 よりも量子収率が高い傾向にあることがわかった。以上より、Good 1 は他のグループよりも生育良好の個体が多い傾向の示されることが示された。

Good 3 の特徴としては 4 ランク評価が Bad 2 や Bad 3 より良好で、SPAD 値が Bad 2 や Bad 3 より高いことから、調査時点での生育状態は良好傾向にあった。しかし、当年枝成長量は Bad 2 や Bad 3 と有意差がなかった。前年枝および前々年枝成長量についても Bad 2 や Bad 3 と有意差がなかった。光化学系 II の量子収率については、Good 3 は定常励起光強度 50, 100, 300, 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ のフェーズで量子収率が Good 1 より低かった。以上より、Good 3 は Good 1 よりも生育不良傾向の個体が多く混ざるグループであることが示された。

Bad 2 の特徴としては 4 ランク評価が Good 1 や Good 3 より不良で、SPAD 値が Good 1 や Good 3 より低く、当年枝成長量が Good 1 よりも少なかったことから、調査時点での生育状態は不良であった。また、胸高直径が Good 1 より小さく、樹高が Good 1 や Good 3 より低いことから、長期的にも生育状態は不良傾向であった。光化学系 II の量子収率については、Bad 2 は Fv/Fm が Good 1 より小さく、定常励起光強度 100, 300, 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ のフェーズで量子収率が Good 1 より低かったことから、Bad 2 は Good 1 よりも量子収率が低い傾向にあることがわかった。以上より、Bad 2 は Good 1 や Good 3 よりも不良傾向にあることが示された。

Bad 3 の特徴としては 4 ランク評価が Good 1 や Good 3 より不良で、SPAD 値が Good 1 や Good 3 より低く、当年枝成長量が Good 1 よりも少なかったことから、調査時点での生育状態は不良であった。また、胸高直径が Good 1 や Good 3 より小さく、樹高が Good 1 や Good 3 より低く、前年枝および前々年枝成長量は Good 1 より少ないことから、長期的にも生育状態は不良傾向であった。光化学系 II の量子収率については、Bad 3 は Fv/Fm が Good 1 より小さく、定常励起光強度 100, 300, 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ のフェーズで量子収率が Good 1 より低いことから、Bad 3 は Good 1 よりも量子収率が低い傾向にあることがわかった。以上より、Bad 3 は Good 1 や Good 3 よりも不

良傾向にあることが示された。

分類木モデルの第 1 分岐の正答率は 81.8 % (27 枚/33 枚) であり, 18.2% のサンプル (6 枚/33 枚) については予測が誤っていたが, 正しく予測されたサンプル (Good 1) は調査時点や長期の生育状態, 光化学系 II の量子収率が他のグループよりも良好な個体であったことから, 10.0 秒の DF が大きいことが, サクラ類の生育良好な個体の指標となる可能性が示された。

分類木モデルの第 2 分岐の正答率は 100.0 % (15 枚/15 枚) であり, 正しく予測されたサンプル (Bad 2) は調査時点や長期の生育状態, 光化学系 II の量子収率が不良な個体であったことから, 10.0 秒の DF が小さいことに加え, 8.0~9.0 秒の DF の減衰の速さがサクラ類の生育不良の個体の指標となる可能性が示された。

分類木モデルの第 3 分岐の正答率は 75.8 % (25 枚/33 枚) であり, 正しく予測されたサンプル (Good 3) であっても Good 1 よりも生育不良傾向の個体が多く混ざっていたことから, サクラ類の生育状態を予測するための有効な分岐条件にはなっていない可能性が考察された。

以上の結果から, 微弱発光計測装置を用いて, 暗処理後に 10 秒間の遅延蛍光を計測することによって, サクラ類の生育状態 (良好・不良の傾向) を約 80 % の正答率で予測可能であることが示唆された。今後の課題としては, 対象とする樹種や個体数を増やし, 結果の普遍性を確認することが挙げられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

今西純一、幾島祐子、勝又政和. 2016. 遅延蛍光によるヤマザクラ個葉の急性乾燥ストレスの評価. ランドスケープ研究オンライン論文集 9, 51-57. 査読有.

〔学会発表〕(計 4 件)

Imanishi, J., Ikushima, Y. and Katsumata, M. On-site evaluation of growing status of flowering cherry trees using delayed fluorescence. International Consortium of Landscape and Ecological Engineering (ICLEE) 8th Conference, 2017 年 9 月 23 日, 名古屋大学 (愛知県名古屋市).

Imanishi, J., Ikushima, Y. and Katsumata, M. Detection of acute drought stress on four woody species using delayed fluorescence. The 7th East Asian Federation of Ecological Societies International Congress, 2016 年 4 月 20 日, Daegu (Korea).

今西純一、小林祐子、勝又政和. ヤマザクラの急性乾燥ストレス評価における遅延蛍光の有効性. 第 63 回日本生態学会大会, 2016 年 3 月 24 日, 仙台国際センター (宮城県仙台市).

Imanishi, J., Kobayashi, Y. and Katsumata, M. Development of a new instrument that assesses tree vigor based on delayed fluorescence. The 4th International Conference of Urban Biodiversity and Design (URBIO2014), 2014 年 10 月 11 日, Incheon (Korea).

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: METHOD FOR EVALUATING VITALITY OF PLANT, AND MEASUREMENT SYSTEM AND EVALUATION SYSTEM

発明者: Junichi IMANISHI, Masakazu KATSUMATA, Yuko KOBAYASHI

権利者: Kyoto University, HAMAMATSU PHOTONICS K.K.

種類: Application

番号: 14/277,209

出願年月日: 2014 年 5 月 14 日

国内外の別: 外国

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今西 純一 (IMANISHI, Junichi)

京都大学・地球環境学堂・助教

研究者番号: 80378851